

## University of Groningen

### New molecular mechanisms of aging regulation

Sen, Ilke

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Sen, I. (2018). *New molecular mechanisms of aging regulation*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

#### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

#### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# Chapter 7

Nederlandse samenvatting

Veroudering is een complex fenomeen: het resultaat van een opeenstapeling van schade, verhoogde deregulatie van biologische processen en het verlies van cellulaire homeostase. Deze factoren tezamen resulteren geleidelijk in een afname van functie in een organisme in de tijd.

Het is interessant te zien dat veroudering geen statisch proces is, maar zeer sterk gereguleerd wordt door een netwerk aan signaalroutes, allen met elkaar verbonden. Dit netwerk reguleert voornamelijk de activiteit van stress respons routes aangaande het voorkomen van veroudering en routes die de levensduur promoten.

In dit proefschrift heb ik nieuwe mechanistische inzichten aangetoond aangaande de regulatie van transcriptie van genen die weerstand bieden tegen stress en van genen die de levensduur promoten. Hiervoor heb ik gebruik gemaakt van het modelorganisme *C. Elegans*. De focus lag daarbij op wellicht de meest bekende regulatoire signaalroute in veroudering die tot dusver bekend is: de insuline/IGF-like signaalroute (IIS) met zijn *downstream* transcriptiefactor DAF-16/FOXO. Door aan te tonen en te evalueren hoe DAF-16 en een aantal van zijn essentiële co-factoren, op zowel genetisch als biochemisch vlak een interactie met elkaar aangaan, hebben we belangrijke nieuwe inzichten gekregen in hoe DAF-16 wordt gereguleerd en hoe DAF-16 zich op zijn *downstream* genen richt. Hopelijk kan deze informatie een bijdrage leveren aan vernieuwende ontwikkelingen op mechanistisch gebied van interventies tegen het verouderingsproces en de daaruit voortvloeiende verouderingsgerelateerde ziekten.

Het eerste deel van dit proefschrift, **hoofdstuk 2**, omvat een overzicht van de relatie tussen het epigenoom, veroudering én signaalroutes die veroudering reguleren, met daarbij een specifieke focus op hoe het epigenoom de transcriptiefactoren betrokken bij de regulatie van veroudering beïnvloedt en vice versa. We hebben benadrukt wat het belang is van de beschikbaarheid van genen betrokken bij de regulatie van veroudering. Deze beschikbaarheid van genen wordt sterk beïnvloed door het epigenoom en de daaruit voortvloeiende chromatine status op deze loci. Bovendien hebben we bewezen hoe de signaalroutes betreffende de regulatie van veroudering ook actief het epigenoom kunnen vormen, en dus kunnen gebruiken om fenotypes op transcriptieniveau te bewerkstelligen.

In **hoofdstuk 3** hebben we de combinatorische rol van twee transcriptiefactoren, te weten DAF-16 en de helix-loop-helix transcriptiefactor HLH-30/TFEB, gekarakteriseerd. HLH30/TFEB is een bekende hoofdregulator van autofagie en van de biogenese van lysosomen. We hebben de nieuwe observatie gedaan dat HLH-30 eigenlijk een veel bredere rol heeft als regulator van veroudering en het weerstand bieden tegen stress en daarbij zeer nauw samenwerkt met DAF-16/FOXO. We lieten zien dat tijdens schadelijke condities, DAF-16 en HLH-30 beide naar de kern gaan en daar een complex vormen. Tezamen als complex bezetten ze veel doelpromotoren, waarbij ze een groot aantal *downstream* doelgenen co-reguleren. Het is interessant te zien dat de genetische interactie tussen deze twee transcriptiefactoren afhankelijk is van de *upstream* stimulus en dat dit tezamen het

fysiologische resultaat voor het organisme regelt. Ze werken bijvoorbeeld in dezelfde route en ze zijn van elkaar afhankelijk: om de levensduur te verlengen bij een lage IIS, of in organismen met een deficiëntie in de kiembaan, of om weerstand tegen oxidatieve stress te induceren. Echter, in de hitte stress respons werken ze onafhankelijk van elkaar en tijdens dauer formatie werken ze elkaar zelfs tegen. Uiteindelijk hebben we laten zien dat hun samenwerking en communicatie in een op maat gemaakte transcriptierespons op verschillende stimuli resulteert, welk leidt tot een weerstand tegen stress, het maken van bepaalde beslissingen tijdens de ontwikkeling, en de verlenging van de levensduur.

In **hoofdstuk 4** hebben we de aandacht gevestigd op een essentiële positieve regulator van DAF-16/FOXO genaamd SMK-1/SMEK. We hebben het mechanisme opgehelderd op welke manier het de expressie van vele DAF-16 doelgenen beïnvloedt. Om het volledige mechanisme te ontrafelen hebben we in eerste instantie de bindingpartners van SMK-1 bekeken via een immunoprecipitatie op grote schaal, gevolgd door de identificatie van eiwitten tijdens die co-purificatie via massa spectrometrie. Hieruit bleek dat SMK-1 een onderdeel is van een specifiek Protein Phosphatase 4 (PP4) complex en dat het zijn rol in de regulatie van veroudering speelt als onderdeel van dit complex. Wanneer PP4<sup>SMK-1</sup> vermindert tijdens een laag IIS leidt dit tot een kleine vertraging van het naar de kern gaan van DAF-16 en ook de binding van DAF-16 aan zijn doelpromotoren is verminderd. Echter, dit fenomeen kon niet voldoende verklaren waarom de rol van PP4<sup>SMK-1</sup> in de regulatie van veroudering zo belangrijk is, zoals bijvoorbeeld voor de expressie van de doelgenen van DAF-16. Om een beter beeld te krijgen hebben we de rol van het RNA polymerase II (Pol II) met ChIP-Seq onderzocht tijdens een lage IIS. We vonden een PP4<sup>SMK-1</sup>-afhankelijk defect in het aantrekken van Pol II en het starten van de transcriptie van genen geactiveerd door DAF-16, met andere woorden de genen die tezamen geactiveerd worden door DAF-16 en PP4<sup>SMK-1</sup>. Tijdens de zoektocht naar een relevant substraat voor PP4<sup>SMK-1</sup>, welk leidt tot dit defect in het starten van transcriptie, hebben we eerst gekeken naar DAF-16 zelf. Echter, we hebben geen fysieke interactie gevonden tussen PP4<sup>SMK-1</sup> en DAF-16, noch hebben we gezien dat er een SMK-1-afhankelijke verandering in fosforylatiestatus van DAF-16 plaatsvond tijdens een laag IIS. We hebben aldus massa spectrometrie gebruikt om het volledige SMK-1-afhankelijke fosfo-proteoom te identificeren. De kandidaten die zich voordeden hebben we genetisch gescreend. Dit resulteerde in een topfavoriet, de transcriptie/elongatie factor SPT-5. Naar aanleiding van al gepubliceerde kennis over SPT-5 en onze verdere eigen analyses zijn we tot het volgende model gekomen: SPT-5 is essentieel voor transcriptie, het is nodig tijdens verschillende fosforylatiestatussen: tijdens het aantrekken van Pol II (gedefosforyleerd), het starten van transcriptie (gedefosforyleerd) en het verlengen van transcriptie (gefosforyleerd). Aan het einde van de transcriptie moet SPT-5 weer gedefosforyleerd worden, zodat het terug kan keren naar een promotor en een nieuwe ronde van transcriptie kan katalyseren. PP4<sup>SMK-1</sup> is het fosfatase welk deze defosforylatie bewerkstelligt; bij zijn afwezigheid is er een tekort aan gedefosforyleerd SPT-5, waardoor het aantrekken van Pol II en de start van de

transcriptie aangetast wordt. Wij denken dat dit bij voorkeur betrekking heeft op de doelgenen van DAF-16 tijdens een laag IIS, aangezien hun expressie vooral afhankelijk is van de beperkende stap van het starten van transcriptie.

Samenvattend kunnen we zeggen dat we een cruciaal hiaat in het mechanistische plaatje hebben gedicht in hoe DAF-16 zijn doelgenen reguleert om weerstand tegen stress te bieden en de levensduur te promoten.